

На правах рукописи



КАДЫРОВА ГУЗЕЛЬ ДАМИРОВНА

**АНАЛИЗ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ
НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ЯДЕРНОГО И
ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ГЕНОМОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ
РОДА FAGOPYRUM**

03.01.04 – Биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Казань, 2011.

Работа выполнена в Центре «Биоинженерия» РАН и в отделе сельскохозяйственной биотехнологии ГНУ ТатНИИСХ

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Кочиева Елена Зауровна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Шарипова Маргарита Рашидовна

доктор биологических наук
Кудрявцев Александр Михайлович

Ведущая организация: ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур


Защита состоится 9 июня 2011 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская д.18, главное здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета

Автореферат разослан « ____ » _____ 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук



З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Гречиха является одной из важнейших продовольственных культур, обладающей высокой питательной и лечебно-профилактической ценностью. Белки плодов гречихи по питательности полноценнее белка злаков и приближаются к белкам бобовых культур. Кроме того, плоды гречихи обладают высокими диетическими свойствами благодаря повышенному содержанию в составе крупы легкорастворимых фракций белка, незаменимых аминокислот, ненасыщенных жирных кислот, витаминов, особенно рутина, и минеральных солей.

Род *Fagopyrum* Mill. (Гречишные) относится к семейству *Polygonaceae*. Из 17 видов *Fagopyrum* культивируются только два: гречиха посевная (*F. esculentum*) и гречиха татарская (*F. tataricum*). Генофонд культурных видов *Fagopyrum*, отличается небольшим морфо-биологическим разнообразием [Fesenko *et al.*, 2001, Yamane *et al.*, 2004]. Он сравнительно слабо исследован и выявление генетического потенциала гречихи, в том числе по различным хозяйственно-ценным признакам (фармакологическим и адаптивным свойствам, экологической устойчивости) является особенно актуальным.

В связи с этим разработка биохимических методов идентификации полиморфизма ядерной и цитоплазматической ДНК последовательностей геномов и селекционно-значимых генов как культивируемых, так и дикорастущих видов имеет большую значимость для исследований прикладного характера, направленных на расширение биоразнообразия культивируемых видов гречихи с улучшенными качественными и урожайными свойствами. Данные, полученные при исследовании информативных участков ядерной и цитоплазматической ДНК, могут широко использоваться как при определении уровней межвидовой и внутривидовой вариабельности нуклеотидных последовательностей, так и при создании видовых и сортовых ДНК-маркеров для паспортизации сортов и линий гречихи.

Помимо культивируемых видов, род *Fagopyrum* включает 15 диких видов, большинство из которых открыты и описаны лишь в конце 90-х годов прошлого столетия. Поэтому для некоторых видов до конца не определены филогенетические отношения и таксономический статус. Как известно, эволюционные исследования, таксономические классификации базируются на использовании данных о вариабельности нуклеотидных последовательностей ДНК таксонов. Однако, что касается видов *Fagopyrum*, эта тема остается недостаточно изученной. Так, большая часть биохимических и молекулярных исследований генома была сфокусирована в основном на анализе культивируемых видов гречихи [Eggum *et al.*, 1980, Kreft *et al.*, 2002, Bourbouze *et al.*, 2008], в то время как вариабельность ДНК последовательностей остальных видов исследована слабо.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось выявление вариабельности нуклеотидных последовательностей ядерной и цитоплазматической ДНК геномов видов рода *Fagopyrum*.

Для достижения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

1. Определить уровни межвидового и внутривидового полиморфизма ядерной ДНК представителей рода *Fagopyrum* методом AFLP анализа вариабельности нуклеотидных последовательностей.

2. С использованием нескольких систем мультилокусного маркирования (RAPD, ISSR, AFLP) провести анализ внутривидового полиморфизма ядерной ДНК культурных видов гречихи *F. esculentum* и *F. tataricum*.

3. Провести SSR анализ полиморфизма отдельных микросателлитных ДНК-локусов образцов видов *F. esculentum*, *F. homotropicum*, *F. tataricum* и *F. cymosum*. Определить аллельные варианты микросателлитных локусов и частоты их встречаемости у видов и образцов *Fagopyrum*.

4. Провести анализ вариабельности нуклеотидных последовательностей хлоропластной ДНК гречихи. Охарактеризовать ранее не исследованные последовательности спейсерных участков (*trnL-trnF*, *psbA-trnH*, *trnT-trnY*) и интрона гена *rpS16* хпДНК *Fagopyrum* и оценить возможность их использования в таксономических и филогенетических исследованиях.

5. Провести анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей митохондриальной ДНК (ген *cox1* и b/c интрона гена *nad1*) видов *Fagopyrum*. Определить уровни внутривидового и межвидового полиморфизма последовательностей анализируемых образцов.

6. На основе комплексного анализа нуклеотидных последовательностей ядерной и цитоплазматической ДНК провести сравнительную оценку филогенетических отношений анализируемых представителей рода *Fagopyrum*.

Научная новизна. Впервые с использованием нескольких систем мультилокусного маркирования проанализирована последовательность ядерной ДНК представителей *Fagopyrum*. Определены уровни внутривидового и межвидового полиморфизма дикорастущих и культурных видов гречихи, включая сорта отечественной селекции. Впервые исследовано внутрисортное разнообразие *F. esculentum* и показан высокий уровень полиморфизма ДНК отечественных сортов, сравнимый с разнообразием дикорастущих форм этого вида. Получены видо-, образец- и сортоспецифичные ДНК фрагменты.

Анализ 11 микросателлитных ДНК-локусов гречихи показал высокую специфичность проанализированных праймерных пар к представителям группы *cymosum*. Каждый локус охарактеризован числом идентифицированных аллельных вариантов, частотами их встречаемости у исследованной группы образцов и уровнем аллельного полиморфизма (PIC). Для каждого исследованного сорта и образца рода *Fagopyrum* установлена микросателлитная формула, которая может быть использована для составления молекулярно-генетического паспорта.

Впервые проведен анализ вариабельности нуклеотидных последовательностей хлоропластной (спейсерные участки *trnT-trnY*, *trnL-trnF*, *psbA-trnH*, интрон гена *rpS16*) и митохондриальной (ген *cox1* и

b/c интрон гена *nad1*) ДНК гречихи. Для каждого вида были выявлены видоспецифичные нуклеотидные замены и индели, которые могут использоваться для филогенетических и таксономических исследований и выявления полиморфизма представителей рода *Fagopyrum* на разных таксономических уровнях. Впервые на примере последовательностей интрона хлоропластного гена *rpS16* и b/c интрона митохондриального гена *nad1* определены вторичные структуры автосплайсирующихся интронов группы II у видов *Fagopyrum*; определены границы всех шести доменов интрона и их основные функционально-значимые мотивы.

Практическая значимость. Данные о межвидовых и межсортовых различиях нуклеотидных последовательностей могут быть использованы для подбора родительских форм в скрещиваниях и идентификации сортов, анализе гибридов и определении сортовой чистоты семенного материала.

Положения, выносимые на защиту:

1. межвидовой и внутривидовой полиморфизм последовательностей ядерной ДНК дикорастущих и культивируемых видов рода *Fagopyrum*.
2. аллельные варианты и частоты встречаемости микросателлитных локусов у представителей рода *Fagopyrum*.
3. вариабельность нуклеотидных последовательностей хлоропластной и митохондриальной ДНК геномов как критерий таксономической и филогенетической характеристики вида.

Апробация работы. Результаты проведенных исследований были представлены и докладывались на IX Международном конгрессе по геномике растений PlantGEM (Istanbul, 2011), на 11-м международном симпозиуме по гречихе «Advances in buckwheat research» (Orel, 2010), на 2-м международном конгрессе «Molecular Phylogenetics» (Moscow, 2010), на Всероссийской конференции «Актуальные проблемы сельскохозяйственной науки и практики в современных условиях и пути их решения» (Казань, 2009), на Всероссийской конференции «Инновационное развитие агропромышленного комплекса» (Казань, 2009), на Всероссийской конференции «Повышение эффективности растениеводства и животноводства – путь к рентабельному производству» (Казань, 2008), на научно-практической конференции «Генетика и селекция растений» (Москва, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ из них 3 – в рецензируемых научных журналах

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на печатных страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего наименований. Работа содержит таблиц и рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Была составлена коллекция 62 образцов *Fagopyrum*, представляющая 17 видов и охватывающая основные ареалы произрастания и культивирования гречихи. Дикорастущие виды *F. cymosum*, *F. homotropicum*, *F. gracilipes*,

F. capillatum, *F. rubifolium*, *F. callianthum*, *F. macrocarpum*, *F. leptopodum*, *F. lineare*, *F. pleioramosum*, *F. statice*, *F. gilesii*, *F. jinshaense*, *F. urophyllum* были любезно предоставлены проф. О. Ониши Университета Киото (Япония) и И.Н. Фесенко ГНУ ВНИИЗБК. Образцы культивируемых видов *F. esculentum* и *F. tataricum* получены из коллекции ГНУ ГНЦ РФ ВИР; сорта *F. esculentum* из ТатНИИСХ (Казань) и ВНИИЗБК (Орел). В анализ в качестве внешней группы был включен представитель рода *Rheum* L. семейства *Polygonaceae*.

Выделение тотальной растительной ДНК производили на основании стандартной методики [Edwards *et al.*, 1991] с дополнительной депротеинизацией смесью фенол/хлороформ. AFLP-, RAPD- и ISSR-анализы проводили по стандартным методикам [Vos *et al.*, 1995, Williams *et al.*, 1990]. SSR анализ микросателлитных ДНК-локусов и последующую статистическую обработку данных проводили согласно Konishi *et al.*, 2006. Все амплифицированные фрагменты секвенировали с использованием как прямого, так и обратного праймера на ABI 310 capillary DNA Analyzer (Центр «Биоинженерия» РАН). Выравнивание и анализ последовательностей проводили с помощью программы MEGA 3 [Kumar, 2004]. Статистический анализ проводили с использованием методов максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML), объединения соседей (Neighborhood-Joining, далее NJ) и максимальной парсимонии (Maximum Parsimony, далее MP) в программах MEGA 3 [Kumar, 2004] и PAUP 4.0b10 [Swofford, 2002], а также Байесовского подхода (Bayesian Inference, BI) в программе MrBayes v3.0b3 [Huelsenbeck, Ronquist, 2001], методом UPGMA с использованием коэффициента Nei-Li (TREECON). Эволюционные модели для анализов выбирали в программе Modeltest 3.04 [Posada, Crandal, 1998]. При BI анализе создавали 1 миллион генераций цепей Маркова, отбирая пробы каждой сотой генерации. Устойчивость филогенетических деревьев в NJ и MP анализах оценивали методом бутстрепа по 1000 репликам.

Результаты и обсуждение

Молекулярный анализ ядерного генома *Fagopyrum*. Впервые для оценки вариабельности ядерной ДНК применен подход с использованием нескольких систем мультилокусного маркирования ДНК последовательностей (RAPD, ISSR, AFLP), позволяющих анализировать межвидовую и внутривидовую вариабельность функционально различных (уникальных, умеренно- и высокоповторяющихся) областей генома.

AFLP маркирование генома *Fagopyrum*. В AFLP-анализ были взяты образцы ДНК 58 представителей рода *Fagopyrum*, двух филогенетических групп: *cymosum* (*F. esculentum*, *F. homotropicum*, *F. tataricum*, *F. cymosum*, *F. giganteum*) и *urophyllum* (*F. gracilipes*, *F. capillatum*, *F. rubifolium*, *F. callianthum*, *F. macrocarpum*, *F. leptopodum*, *F. lineare*, *F. urophyllum*). Все исследуемые виды были представлены 1-23 образцами из различных мест произрастания. Были подобраны AFLP комбинации фермент/праймер, позволяющие выявлять полиморфизм ДНК образцов гречихи, и пригодные для использования при оценке генетического разнообразия видов *Fagopyrum*. Наилучшие результаты дала комбинация эндонуклеаз *EcoRI/MseI*. Всего при

использовании пяти комбинаций праймеров (E12/M55, E35/M52, E35/M59, E35/M61, E41/M61) выявлено 746 полиморфных AFLP-фрагментов ДНК гречихи, что составило 99.1% от общего числа доступных для анализа фрагментов (рис. 1).

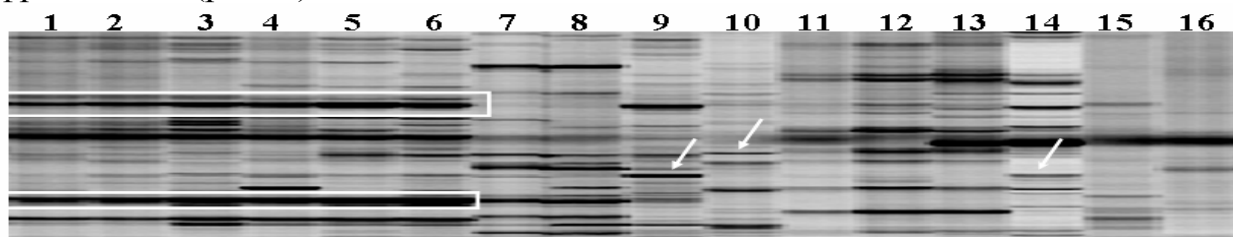


Рис.1. AFLP-спектры видов *Fagopyrum* с праймерной комбинацией E41/M61 (6% полиакриламидный гель). **Обозначения:** дорожки 1-6 виды филогенетической группы *cymosum*; 7-16 виды группы *urophyllum* (приведен фрагмент геля; стрелками указаны видоспецифичные фрагменты, прямоугольниками – фрагменты для комплекса видов).

В результате проведенного AFLP-анализа каждый вид и образец гречихи охарактеризован специфичным спектром AFLP-фрагментов, при этом было получено 245 видоспецифичных ДНК фрагментов и 5 фрагментов, характерных для комплексов видов.

Значения генетических различий (genetic distances, GD) последовательностей ядерного генома между видами филогенетических групп *cymosum* и *urophyllum* находились в пределах от 0.19 (*F. cymosum*/*F. giganteum* – *F. urophyllum*) до 0.33 (*F. esculentum* – *F. rubifolium*). Значения генетического различия для видов группы *urophyllum* находились в пределах от 0.15 (*F. gracilipes* – *F. capillatum*, *F. callianthum* – *F. macrocarpum*) до 0.30 (*F. rubifolium* – *F. leptopodum*/*F. lineare*). Этот же показатель для группы *cymosum* был несколько ниже и находился в пределах от 0.01 (*F. giganteum* – *F. cymosum*) до 0.22 (*F. esculentum* – *F. cymosum*).

Дендрограмма, построенная на основании генетических различий последовательностей ядерной ДНК, выявила четкую дифференциацию всех анализируемых видов *Fagopyrum* на два кластера (рис.2). Первый кластер сформировали виды *Fagopyrum*, образующие филогенетическую группу *cymosum* (*F. esculentum*, *F. homotropicum*, *F. tataricum*, *F. cymosum*, *F. giganteum*), второй – виды группы *urophyllum* (*F. gracilipes*, *F. capillatum*, *F. rubifolium*, *F. callianthum*, *F. macrocarpum*, *F. leptopodum*, *F. lineare*, *F. urophyllum*). Полученные данные подтвердили результаты Ohnishi O. (1998) и Yamane *et al.* (2003), предложивших разделить виды *Fagopyrum* на две филогенетически-эволюционные группы *cymosum* и *urophyllum*.

Внутри кластера *cymosum* выделились два основных субкластера. Первый субкластер объединил виды *F. tataricum*/*F. cymosum*/*F. giganteum*, второй образовали виды *F. esculentum* и *F. homotropicum*. Формирование единой клады образцами видов *F. tataricum* и *F. cymosum* (100% ИБ) свидетельствует об их близком филогенетическом родстве, поддерживая предположение о возможности происхождения *F. tataricum* от *F. cymosum* [Yamane *et al.*, 2003]. Внутри группы *urophyllum* также можно выделить субкластеры *F. gracilipes*/*F. capillatum*/*F. rubifolium*; *F. urophyllum*/*F. lineare* и *F. callianthum*/*F. macrocarpum*/*F. leptopodum* (рис. 2).

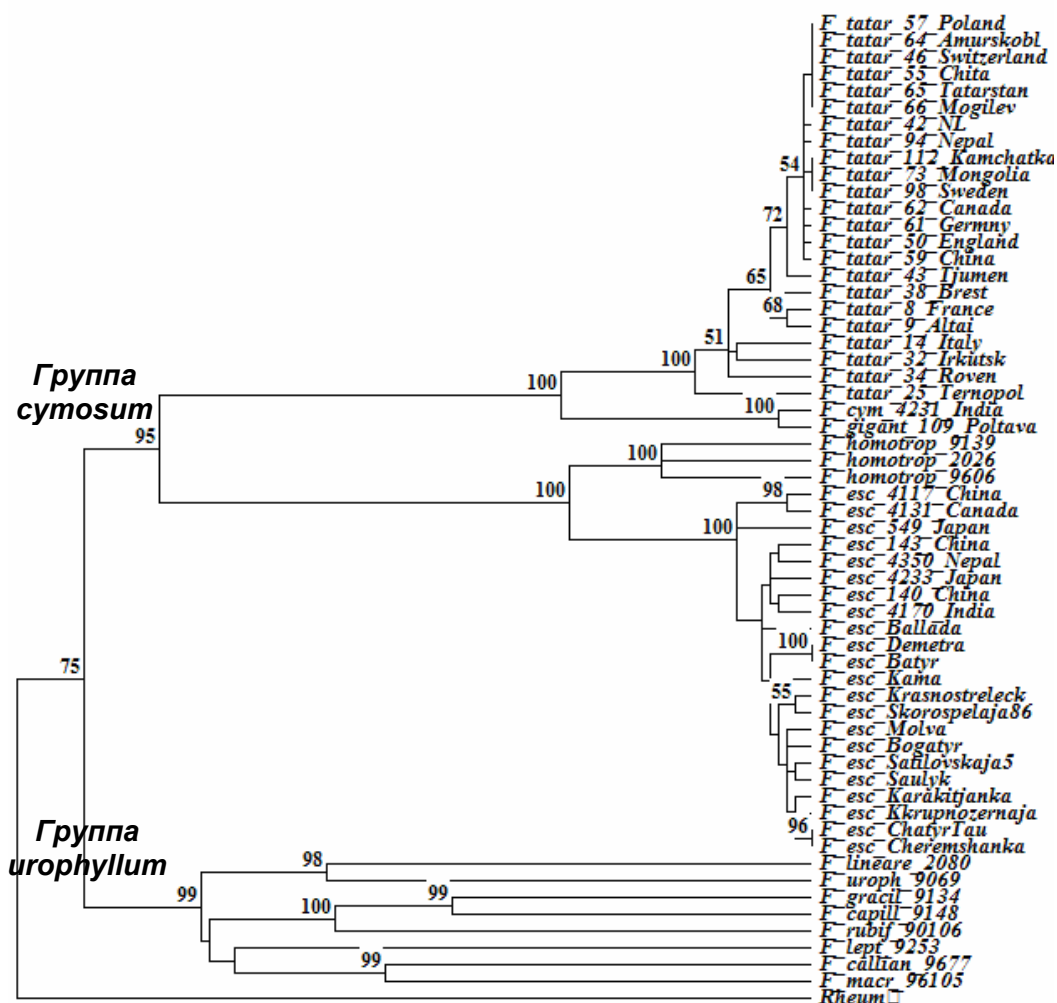


Рис. 2. Дендрограмма, отражающая различия видов *Fagopyrum* на основе данных AFLP-анализа с использованием метода UPGMA (TREECON) (в узлах обозначены индексы бутстрепа)

Графики факторного анализа основных компонент (PCO) (рис. 3) соответствовали кластеризации на дендрограмме и выявили большую близость *F. esculentum* к *F. homotropicum*, а *F. tataricum* к *F. cymosum*/*F. giganteum*.

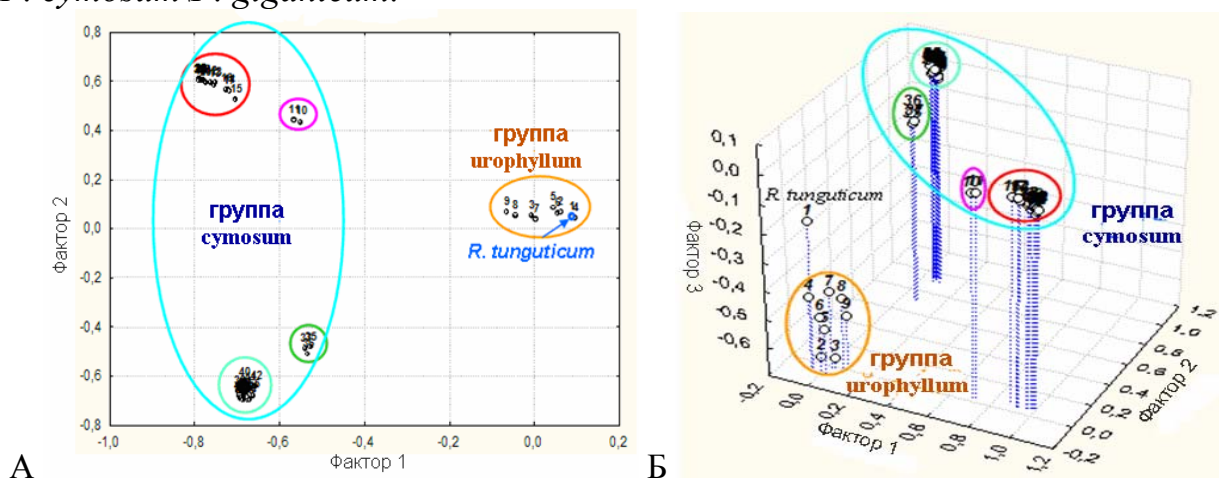


Рис. 3. 2-факторный (А) и 3-факторный (Б) PCO анализ основанный на данных AFLP маркирования и отражающий степень родства видов *Fagopyrum* (PCO описывает 76% (А) и 81% (Б) полиморфизма).

Интересно, что все анализируемые виды группы *urophyllum* показали большее генетическое родство с представителем рода *Rheum*, чем виды группы *cymosum*. Это, возможно, объясняется тем, что они менее интенсивно эволюционировали от общего предка гречихи. В то время как виды группы *cymosum* (*F. esculentum*, *F. homotropicum*, *F. tataricum*, *F. cymosum*), по всей видимости, выделились в отдельную группу намного раньше и начали эволюционировать достаточно интенсивно.

Молекулярный анализ полиморфизма ДНК последовательностей культивируемых видов гречихи. Помимо анализа вариабельности нуклеотидных последовательностей дикорастущих видов гречихи и выявления филогенетических связей у представителей рода *Fagopyrum*, отдельный интерес представлял анализ внутривидового полиморфизма ДНК у представителей двух культивируемых видов гречихи посевной *F. esculentum* (8 дикорастущих образцов, 14 сортов отечественной селекции) и гречихи татарской *F. tataricum* (23 дикорастущих образца). Для выявления внутривидовой вариабельности ядерного генома применяли три метода мультилокусного анализа: AFLP, RAPD и ISSR.

При AFLP маркировании было получено 252 полиморфных фрагмента ДНК видов *F. tataricum* и *F. esculentum*. Анализируемые виды отличались по уровню полиморфизма. Так, для вида *F. esculentum* из 8 образцов, взятых в анализ, для трех были получены специфичные спектры. В случае *F. tataricum* индивидуальные AFLP спектры были получены для 7 из 23 образцов. Также, для 4 селекционных сортов (Скороспелая 86, Молва, Богатырь, Баллада) были получены специфичные AFLP фрагменты, которые могут быть преобразованы в SCAR маркеры данных сортов.

RAPD анализ 47 представителей *Fagopyrum* позволил детектировать 132 полиморфных ДНК фрагмента гречихи длиной от 330 до 2000 п.н. В результате каждый образец был охарактеризован уникальным набором фрагментов. Всего было выявлено 12 фрагментов специфичных для представителей вида *F. esculentum*, 10 – для представителей вида *F. tataricum*. Семь ДНК фрагментов отличали генотипы отдельных сортов. Выявленные уникальные фрагменты, также как и в случае AFLP, впоследствии могут быть использованы для разработки геномспецифичных ДНК маркеров сортов и видов гречихи.

Метод исследования микросателлитных и межмикросателлитных последовательностей (ISSR) приводил к амплификации 89 полиморфных фрагментов ДНК. Также для каждого образца были получены уникальные спектры и ряд родо- и образецспецифичных ISSR фрагментов

На основе полученных RAPD, ISSR и AFLP данных были рассчитаны коэффициенты попарных генетических расстояний (GD), которые показали, что уровень межсортовых различий *F. esculentum* был весьма высок (0.06-0.30) и соответствовал диапазону вариабельности ДНК дикорастущих образцов *F. esculentum* (0.10-0.28) из Японии, Китая, Непала, что говорит о широкой генетической основе отечественных сортов посевной гречихи. Внутривидовой полиморфизм *F. tataricum*, представленного образцами из

разных регионов мира, оказался более чем в два раза ниже (GD 0.01-0.17) и был сравним с данными анализа генома 11 популяций *F. tataricum* (GD 0.02-0.11), исследованных ранее [Sharma *et al.*, 2002].

Существование таких различий в уровнях варибельности ДНК у двух культурных видов гречихи связано, по всей вероятности, с более узкой генетической основой *F. tataricum*, обусловленной самоопылением, а также возможно разницей во времени возникновения видов. Считается, что *F. tataricum* представляет собой сравнительно молодой вид, возникший в результате утраты системы самонесовместимости и быстрого формирования репродуктивной изоляции от предполагаемого предкового вида [Yamane *et al.*, 2003]. Аллогамия, самонесовместимость и преобладание перекрестного опыления у *F. esculentum*, по всей видимости, способствовали поддержанию высокого уровня внутривидовой и внутрисортной гетерогенности, а локальность распространения стародавних сортов гречихи определили отмечаемый высокий уровень межсортного и популяционного разнообразия гречихи *F. esculentum*.

Анализ полиморфизма микросателлитных SSR локусов видов и сортов *Fagopyrum*. В дополнение к проведенному мультилокусному анализу, была определена варибельность последовательностей отдельных микросателлитных локусов ядерной ДНК видов и образцов *Fagopyrum*. Было исследовано 11 SSR локусов гречихи, отобранных из микросателлитной библиотеки *F. esculentum* [Konishi *et al.*, 2006]. Для семи SSR локусов (Fes 1303, Fes 1840, Fes 1368, Fes 1585, Fes 2644, Fes 3177, Fes 3331) при амплификации были получены фрагменты ожидаемой длины. Как и предполагалось, в связи с высокой специфичностью разработанных SSR праймеров, амплификация наблюдалась только у представителей видов группы *cytosum*.

Характеристика полиморфизма микросателлитных локусов. Микросателлитный ДНК-локус Fes 1840 у видов группы *cytosum* был полиморфным и представлен 6 аллельными вариантами (рис.4).

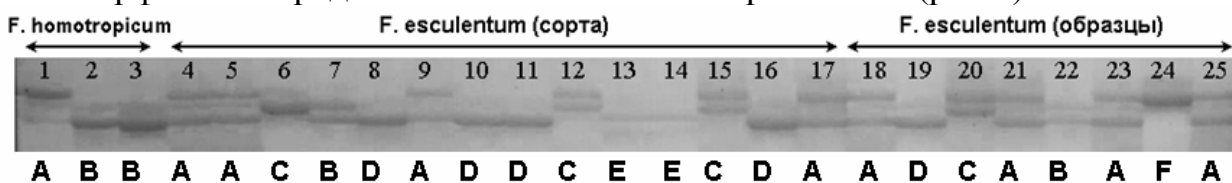


Рис. 4. Аллельные варианты локуса Fes 1840 3 образцов *F. homotropicum*, 14 сортов и 8 образцов *F. esculentum* (6% полиакриламидный гель). Обозначения: А, В, С, D, Е, F – аллельные варианты.

Анализ частот встречаемости каждого аллельного варианта микросателлитного локуса Fes 1840 определялся как отношение количества сортов и образцов, имеющих данный аллельный вариант, к общей выборке. Наиболее представленный у анализируемых образцов был аллельный вариант А (36%), наиболее редкий – аллельный вариант F (4%) (табл.1).

Коэффициенты информативности PIC локуса Fes 1840 для полного набора образцов группы *cytosum* составил 0.77. PIC для образцов *F. esculentum* не превышал 0.71, для сортов отечественной селекции 0.77, а

для образцов *F. homotropicum* значение PIC было на уровне 0.45, что соответствовало данным Konishi *et al.* (2006) для этого локуса. Полученные результаты электрофоретического анализа аллельных вариантов микросателлитов в 6% ПААГе были подтверждены секвенированием.

Табл.1. Полиморфизм последовательностей SSR-локусов 49 сортов и образцов *Fagopyrum*

Локус	Число детектированных аллельных вариантов	Частота встречаемости аллельного варианта, %	Коэффициент PIC
Fes 1840	6	A – 36%, B,C – 16%, D – 20%, E – 8%, F – 4%	0.77
Fes 2644	6	A – 14.3%, B – 20.4%, C – 28.6%, D – 16.3%, E – 12.2%,	0.81
Fes 1303	18	A,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M,N,O,P,R,S – 5.3%, B,C – 10.5%	0.94
Fes 1585	4	A – 27.3%, B – 45.5%, C – 22.7%, D – 4.5%	0.67
Fes 3177	11	A – 31.8%, B,C,D,E,F – 9.1%, G,H,I,J,K – 4.5%	0.85
Fes 1368	16	A – 47.9%, B,C – 8.3%, D – 6.3%, E,F – 4.2%, G,H,I,J,K,L,M,N,O,P – 2.1%	0.75
Fes 3331	14	A – 57.5%, B,C – 7.5%, D,E,F,G,H,I,J,K,L,M,N – 2.5%	0.66

Было показано, что каждый из аллельных вариантов содержал ожидаемый микросателлит (ga)₈, длина которого у исследованных образцов варьировала, и определялась числом повторяющихся единиц микросателлитной последовательности (рис. 5).

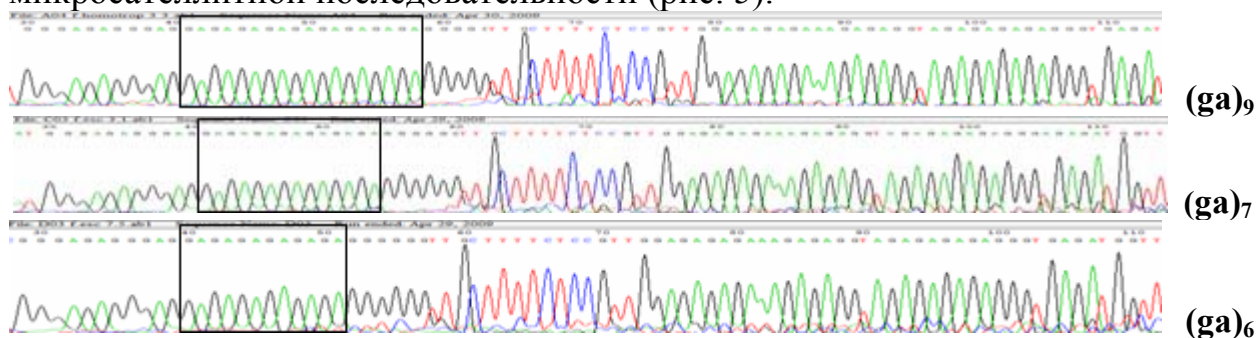


Рис. 5. Примеры вариабельности повтора (ga)₆₋₉ в последовательности микросателлитного ДНК-локуса Fes 1840 видов *Fagopyrum* в программе Chromas 1.45

Анализ остальных отобранных микросателлитных ДНК-локусов Fes 1303, Fes 1368, Fes 1585, Fes 2644, Fes 3177, Fes 3331 проводили по аналогичной схеме.

Таким образом, анализ вариабельности отобранных нами семи микросателлитных локусов у 49 сортов и образцов гречихи выявил 75 аллельных вариантов. Максимальное число аллельных вариантов было идентифицировано для локуса Fes 1303 (18), минимальное – для локуса Fes 1585 (4). Коэффициент PIC взятых в анализ SSR локусов для исследованных сортов и образцов рода *Fagopyrum* варьировал от 0.66 (Fes 3331) до 0.95 (Fes 1303). Для каждого исследованного сорта и образца рода *Fagopyrum* установлена SSR формула, которая может быть использована для составления молекулярно-генетического паспорта.

Анализ полиморфизма последовательностей хлоропластной ДНК видов *Fagopyrum*. Для исследования нуклеотидных последовательностей пластома 17 видов гречихи был проведен детальный анализ и впервые охарактеризованы 4 ранее неисследованные области пластома, включающие

нуклеотидные последовательности межгенных спейсеров *trnL-trnF*, *psbA-trnH*, *trnT-trnY* и интрона гена *rpS16*.

Полиморфизм последовательностей спейсера *trnL-trnF*. В анализ межгенного участка *trnL-trnF* были взяты 29 образцов анализируемых видов *Fagopyrum*, а также образец *Rheum australe*, взятый в качестве внешней группы. В анализируемом наборе вариабельными оказались 67 нуклеотидных сайтов, что составило 16.1% от всей длины выровненной последовательности.

Длина спейсера варьировала от 406 п.н. (виды группы *urophyllum*, за исключением *F. lineare*) до 381-382 п.н (виды группы *cymosum*). Длина *trnL-trnF* участка у *Rheum australe* была наиболее короткой и составила 328 п.н. (рис.6).

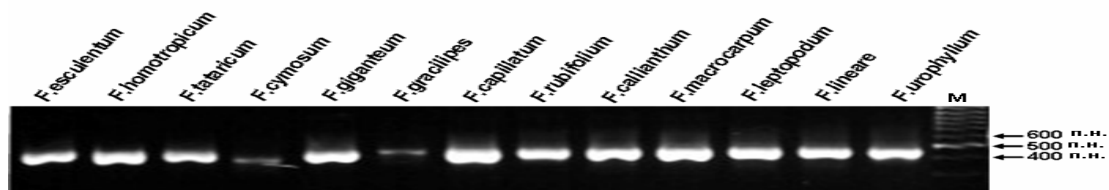


Рис.6. Результаты амплификации спейсерного участка *trnL-trnF* (М – ДНК маркер 1500 – 100 п.н.).

Внутренняя область спейсера всех анализируемых образцов рода *Fagopyrum* характеризовалась присутствием большого числа повторов, число и локализация которых варьировала у представителей разных видов (рис.7).

Так, например, пентануклеотид AAGAG у пяти видов (*F. esculentum*, *F. homotropicum*, *F. tataricum*, *F. cymosum*, *F. giganteum*), образующих группу *cymosum* встречается два раза, в то время как у представителей группы *urophyllum* эта же последовательность повторялась четырежды, причем, дважды в том же положении, что у образцов группы *cymosum*.

Также у видов *cymosum* были выявлены две протяженные делеции: TATGAGTAATAATATGT в положении 156 и CTTGAAAA в положении 124.

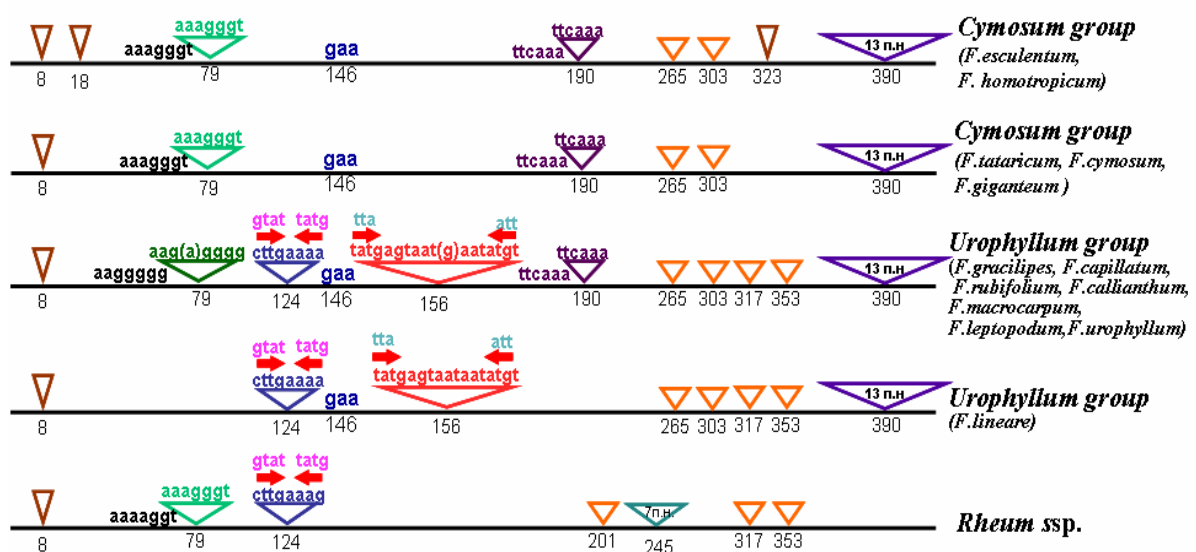


Рис.7. Схема межгенного спейсера *trnL-trnF* у представителей рода *Fagopyrum*, показывающая локализацию инсерций и делеций (треугольниками обозначены инсерции; цифрами - положения нуклеотидов от начала спейсера)

Интересно отметить, что обе они фланкированы короткими инвертированными повторами (GTAT и TTA соответственно), что, по всей вероятности, может говорить о рекомбинационном механизме образования этих делеций.

Помимо инделей, межгенные участки *trnL-trnF* анализируемых видов *Fagopyrum* были насыщены нуклеотидными заменами специфичными, как для отдельных видов, так и для групп видов *cymosum* и *urophyllum*.

Полиморфизм последовательностей спейсера *psbA-trnH*. Длина *psbA-trnH* спейсера варьировала от 435 п.н. (*F. esculentum*) до 473 п.н. (*F. macrocarpum*). Длина участка *psbA-trnH* у представителя рода *Rheum* составила 460 п.н. Вариабельными были 123 нуклеотидных сайта (22.2 %).

Представители разных видов *Fagopyrum* характеризовались своими специфичными наборами инделей и замен (рис.8).

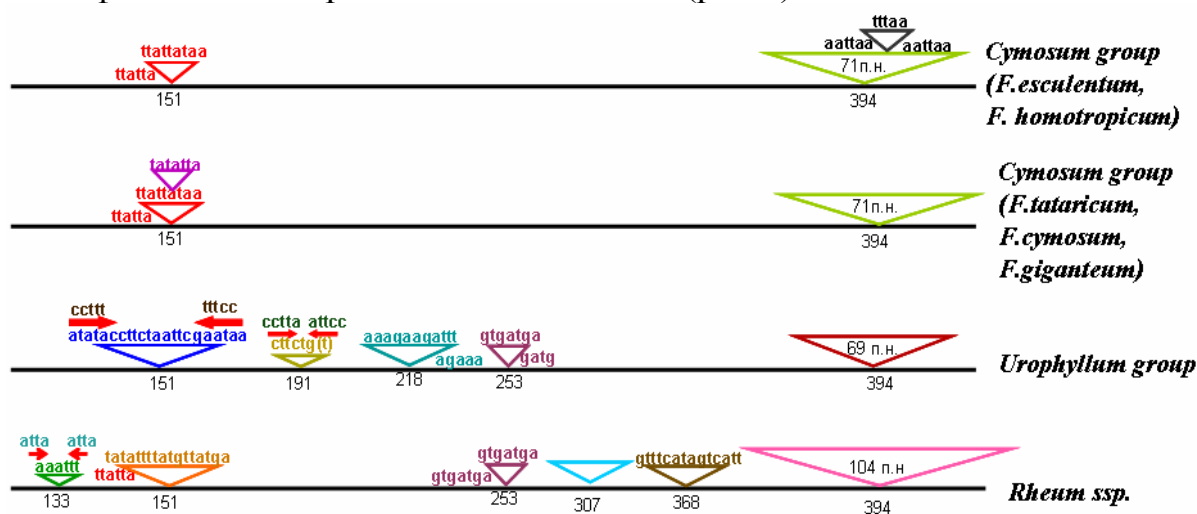


Рис.8. Схема межгенного участка *psbA-trnH* у представителей рода *Fagopyrum*, показывающая локализацию инсерций и делеций (треугольниками обозначены инсерции; цифрами - положения нуклеотидов от начала спейсера)

Как и в случае последовательности спейсера *trnL-trnF* был выявлен ряд нуклеотидных замен, по которым различались группы видов *cymosum* и *urophyllum*. Помимо этого для представителя рода *Rheum* были выявлены нуклеотидные замены, которые были сходными либо с группой *cymosum*, либо с группой *urophyllum*. Наибольшим количеством видоспецифичных точковых замен характеризовалась спейсерная область представителей видов *F. esculentum*, *F. homotropicum*, *F. tataricum*, наименьшим – *F. rubifolium*.

Помимо нуклеотидных замен в последовательности данного спейсера у видов рода *Fagopyrum* были выявлены индели (рис. 8).

Так, у всех образцов *Fagopyrum* и *Rheum tanguticum* в положении 394-п.н. находилась протяженная АТ-богатая инсерция. Данная вставка по длине варьировала от 69 п.н. у представителей группы *urophyllum* рода *Fagopyrum* до 104 п.н. у *Rheum tanguticum*. При анализе вставки было показано, что инсерция по местоположению внутри *psbA-trnH* спейсера была одинакова и начиналась с 394 нуклеотида, но интересно то, что по первичной последовательности она различалась и, таким образом была специфичной для определенных видовых групп (рис.9).

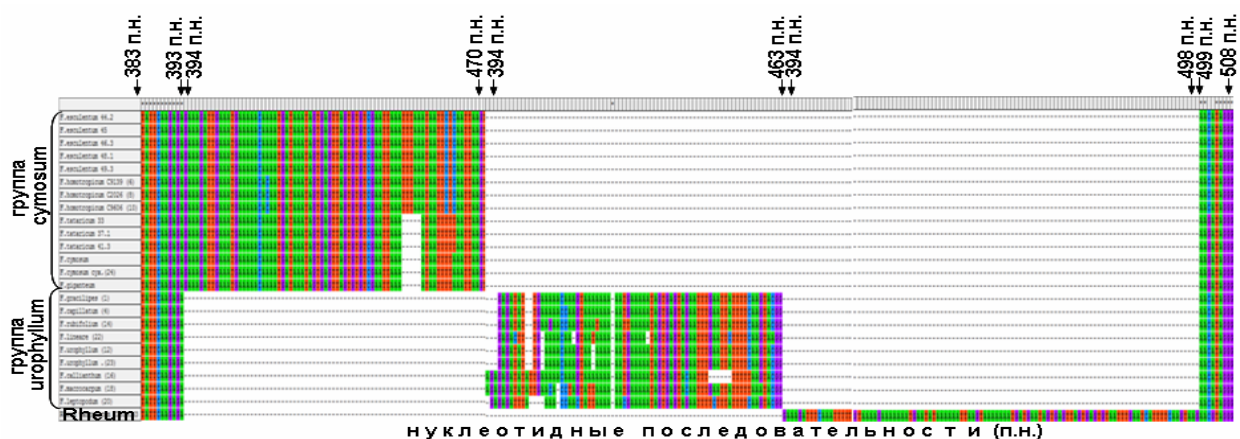


Рис.9. Фрагмент, выровненной нуклеотидной последовательности спейсерного участка *psbA-trnH* у представителей видов *Fagopyrum*

Кроме того, было показано, что хотя *psbA-trnH* спейсер пяти видов группы *cymosum* по последовательности и длине был сходен, но по двум инделям и по специфичным нуклеотидным заменам группа *cymosum* четко разделялась на две подгруппы: первая включала виды *F. esculentum* и *F. homotropicum*, вторая – *F. tataricum*, *F. cymosum* и *F. giganteum*.

Полиморфизм последовательностей спейсера *trnT-trnY*. Размеры спейсера *trnT-trnY* варьировали от 665 п.н. (*F. tataricum*) до 871 п.н. (*F. callianthum*), т.е. различия составляли 206 нуклеотидов, тогда как длина этого же участка у представителя рода *Rheum* достигала 1146 п.н. В анализируемом наборе вариабельными оказались 126 нуклеотидных сайтов, что составило 13.9% от всей длины выровненной последовательности.

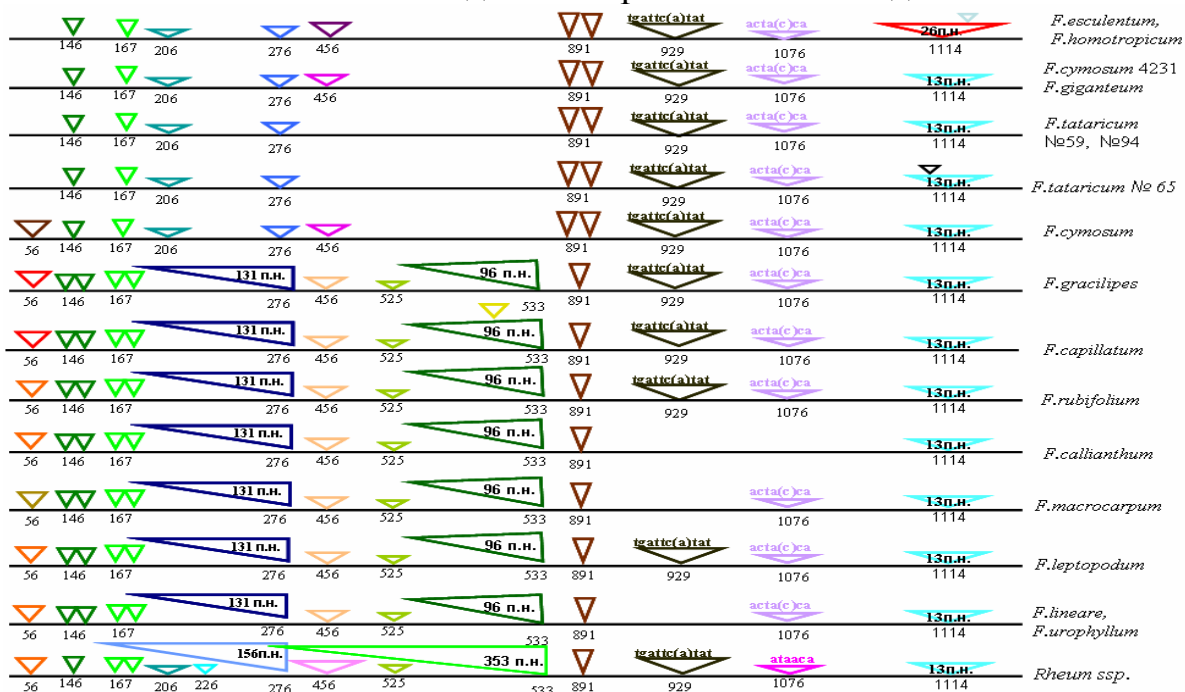


Рис. 10. Схема межгенного участка *trnT-trnY* у представителей рода *Fagopyrum*, показывающая локализацию инсерций и делеций (треугольниками обозначены инсерции; цифрами - положения нуклеотидов от начала спейсера)

Межгенный спейсер *trnT-trnY* у *Fagopyrum* оказался высоко полиморфным и характеризовался протяженными АТ-богатыми инсерциями,

которые встречались по всей последовательности спейсера (56-843 п.н.) за исключением его 5' – и 3' – концевых участков (рис. 10).

При анализе нуклеотидной вставки в положении 276 было показано, что эта инсерция по последовательности отличалась у видов группы *cymosum* и *urophyllum*. Так, инсерция представителей группы *urophyllum* по длине составила 131 п.н., а виды группы *cymosum* характеризовались семинуклеотидной вставкой УТТАТСА (рис. 11). Представитель рода *Rheum* так же характеризовался инсерцией (156 п.н.) в положении 276.

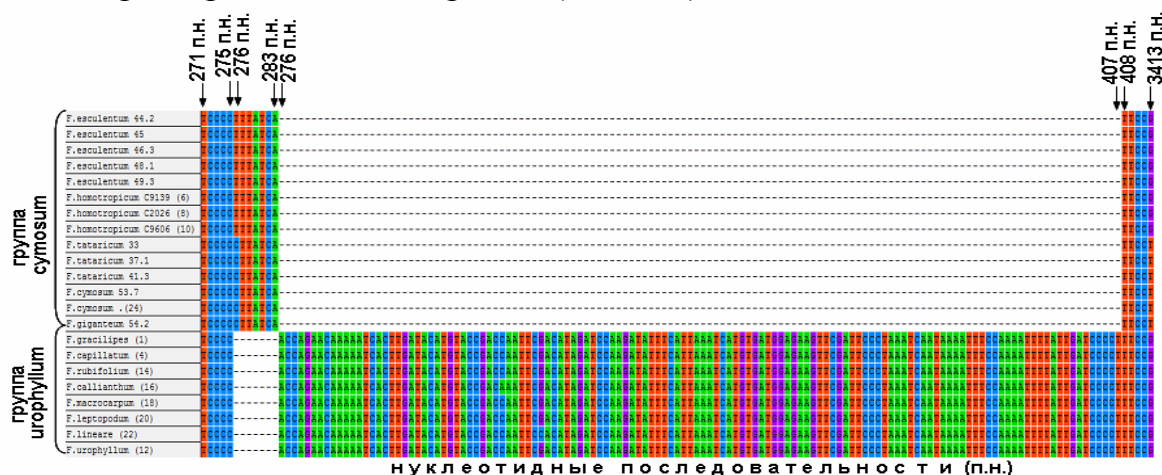


Рис. 11. Фрагмент выровненной нуклеотидной последовательности межгенного спейсера *trnT-trnY* у представителей видов *Fagopyrum*

Кроме инсерций, некоторые виды характеризовались наличием видоспецифичных делеций. Так, у все образцов вида *F. tataricum* детектировалась делеция участка 456-501 п.н., которая присутствовала у всех остальных видов группы *cymosum* (рис. 11).

Помимо инсерций и делеций хпДНК все виды *Fagopyrum* характеризовались нуклеотидными видоспецифичными заменами. Хотелось бы особо отметить, что в результате анализа внутривидовой вариабельности спейсера *trnT-trnY* для видов *F. homotropicum*, *F. tataricum* и *F. cymosum* были впервые выявлены различные образецспецифичные гаплотипы хпДНК.

Полиморфизм последовательностей интрона гена *rpS16*. Размеры интрона *rpS16* у представителей рода *Fagopyrum* варьировали от 744 п.н. (*F. macrocarpum*) до 819 п.н. (*F. homotropicum*), при этом вариабельными оказались 68 нуклеотидных сайтов, что составило 8.2% от всей длины выровненной последовательности.

У всех видов *Fagopyrum* были выявлены свои специфичные наборы нуклеотидных замен, которые можно использовать в дальнейшем для идентификации этих видов гречи. Также некоторые виды характеризовались видоспецифичными инделями (рис. 12). Так, например, у всех представителей рода *Fagopyrum* в положении 661-732 по выровненной последовательности находилась инсерция, которая по длине варьировала от 20 п.н. у группы *urophyllum* до 67 п.н. у *F. esculentum* и *F. homotropicum*. При анализе этой вставки было показано, что ее первичная последовательность различна у различных видов гречи (рис.12).

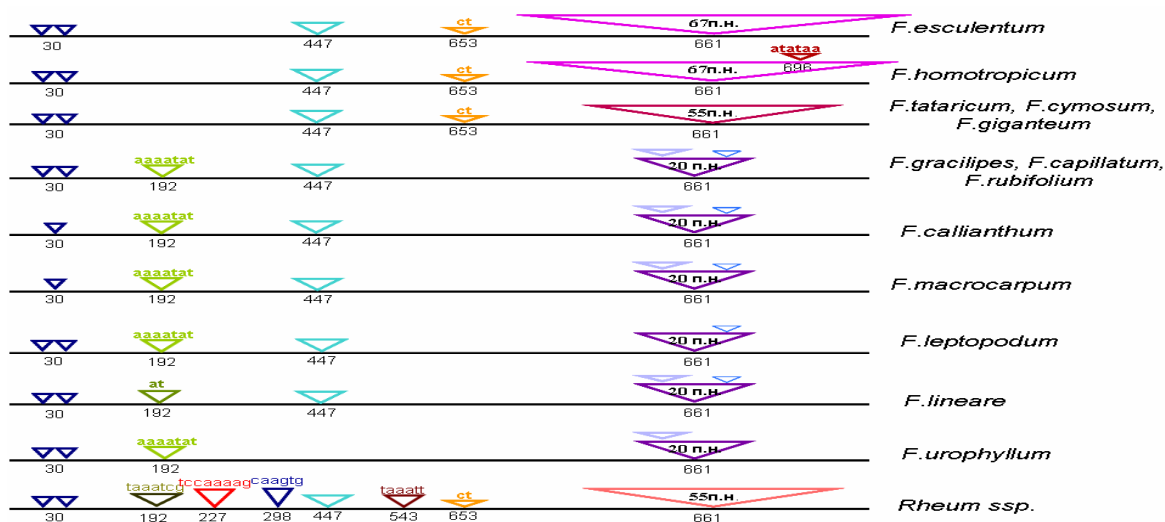


Рис. 12. Схема интрона *rpS16* у представителей рода *Fagopyrum*, показывающая локализацию инсерций и делеций (треугольниками обозначены инсерции; цифрами - положения нуклеотидов от начала спейсера)

Общая дендрограмма, построенная на основании анализа нуклеотидных последовательностей четырех областей хп ДНК показала, что все образцы, взятые в исследование, разделились на два четких кластера (рис.13).

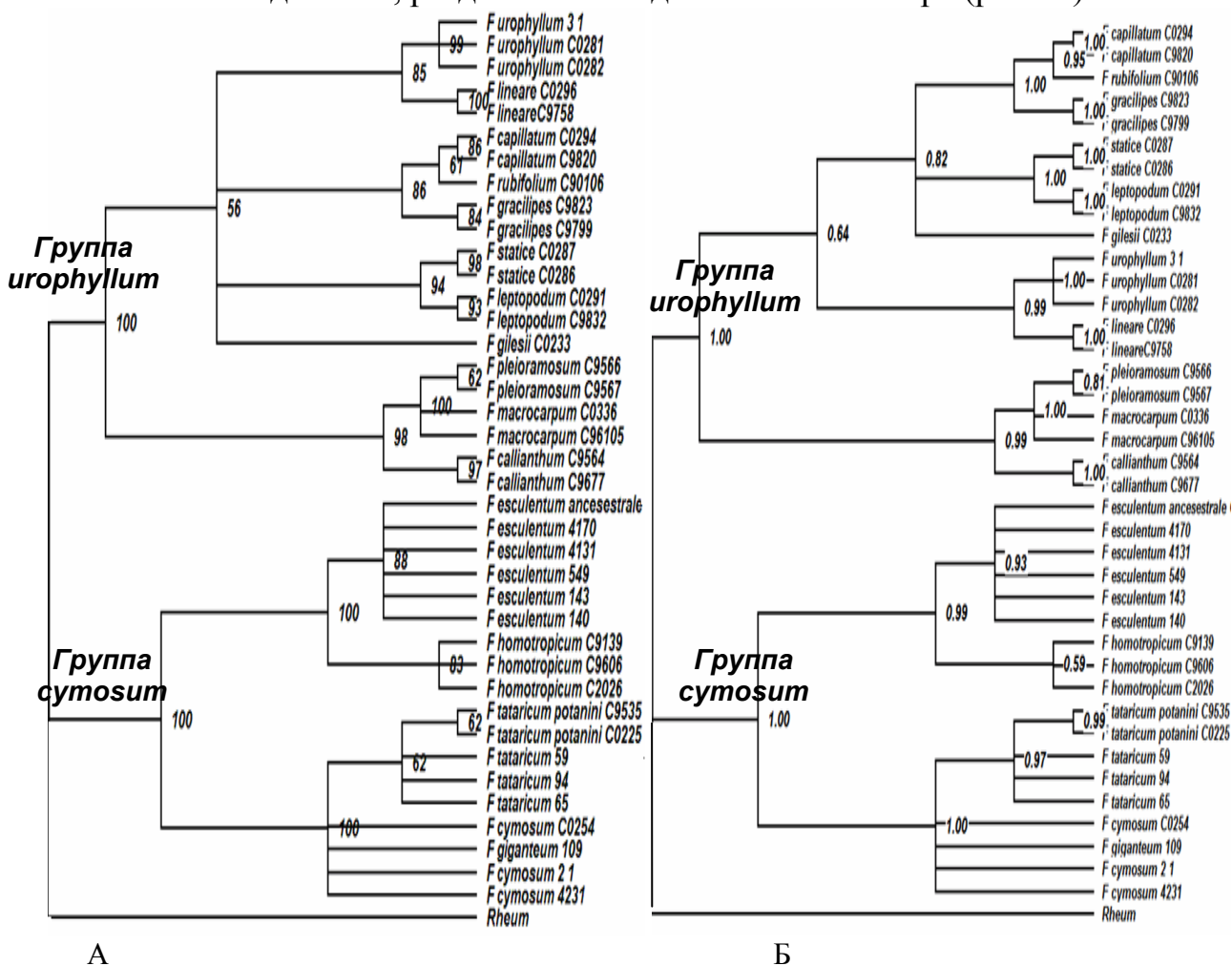


Рис.13. MP(A)- и Bayes (Б) дендрограммы, построенные на основе данных анализа нуклеотидных последовательностей спейсеров *trnL-trnF*, *psbA-trnH*, *trnT-trnY* и интрона гена *rpS16* хлоропластной ДНК, показывающие различия видов *Fagopyrum* (в узлах обозначены индексы бутстрепа (А), индексы Байеса (Б))

Представители видов *F. esculentum*, *F. homotropicum*, *F. tataricum*, *F. cymosum* и *F. giganteum* (группа *cymosum*) объединились в первый кластер. Виды *F. gracilipes*, *F. capillatum*, *F. rubifolium*, *F. callianthum*, *F. macrocarpum*, *F. leptopodium*, *F. lineare*, *F. pleioramosum*, *F. statice*, *F. gilesii*, *F. jinshaense*, *F. urophyllum* (группа *urophyllum*) образовали второй кластер. Внутри первого кластера выделились два четких субкластера, поддерживаемые высокими значениями бутстрепа. Виды *F. esculentum* и *F. homotropicum* образовали первый субкластер, тогда как второй субкластер образовали виды *F. tataricum*, *F. cymosum* и *F. giganteum*. Полученные нами данные совпадают с результатами, приведенными в работе Y. Yasui и O. Ohnishi (1998 a, b) по анализу последовательности хлДНК (спейсер *rbcL-accD*) и ядерной ДНК (последовательность ITS).

Внутри второго кластера, объединяющего виды группы *urophyllum* отдельный субкластер образовали виды *F. gracilipes*, *F. capillatum*, *F. rubifolium*. Также вместе кластеризовались *F. pleioramosum*/*F. macrocarpum*/*F. callianthum*, *F. statice*/*F. leptopodium* и *F. lineare*/*F. urophyllum*. Вид *F. gilesii* образовал отдельную ветвь.

Таким образом, был проведен анализ вариабельности последовательностей хлоропластной ДНК генома 29 образцов 17 видов *Fagopyrum*. Впервые были охарактеризованы последовательности спейсерных участков (*trnL-trnF*, *psbA-trnH*, *trnT-trnY*) и интрона гена *rpS16*. В среднем для каждого образца было проанализировано 3026 п.н. и, таким образом, всего было получено и проанализировано 75650 п.н. хлоропластного генома представителей 17 видов гречихи. Для каждого вида гречихи были выявлены видоспецифичные нуклеотидные замены и индели, которые могут быть использованы для филогенетических и таксономических исследований и выявления полиморфизма пластома *Fagopyrum* на разных таксономических уровнях. Для видов *F. homotropicum*, *F. tataricum* и *F. cymosum* были впервые выявлены гаплотипы.

Анализ вторичной структуры интрона *rpS16* представителей *Fagopyrum*. Хлоропластный ген *rpS16* кодирует рибосомный белок S16 и его интрон относится к группе интронов II типа, которые способны к автономному сплайсингу и считаются эволюционными предшественниками эукариотических интронов [Keating *et al.*, 2010]. Хотя интрон *rpS16* широко использовался в филогенетических исследованиях, функционально значимые для сплайсинга элементы первичной и вторичной структуры интрона описаны только для нескольких растений (*Nicotiana tabacum*, *Aralia chinensis* и *Allium sp*) [Michel *et al.*, 1989, Downie and Katz-Downie, 1999, Ryzhova *et al.*, 2009]. Поэтому представлялось интересным охарактеризовать вторичные структуры *rpS16* у видов гречихи. В результате анализа вторичной структуры интрона *rpS16* у представителей рода *Fagopyrum* были определены границы всех шести доменов интрона и их основные функционально-значимые мотивы (рис. 14). Последовательности доменов III и V были полностью консервативны у всех видов *Fagopyrum*, что согласуется с функциональным значением этих областей для сплайсинга РНК. Наиболее вариабельными были

домены I и IV. Так в последовательности домена IV, помимо нуклеотидных замен, были детектированы 8 инделей, различающихся по длине от 2 до 67 нуклеотидов, при этом некоторые из них были ассоциированы с АТ-богатыми повторами. В домене I была идентифицирована семи нуклеотидная делеция в С-петле у *F. macrocarpum* и *F. capillatum*. В последовательности домена II только у *F. urophyllum* была выявлена двухнуклеотидная делеция, в то время как остальные последовательности были инвариантны.

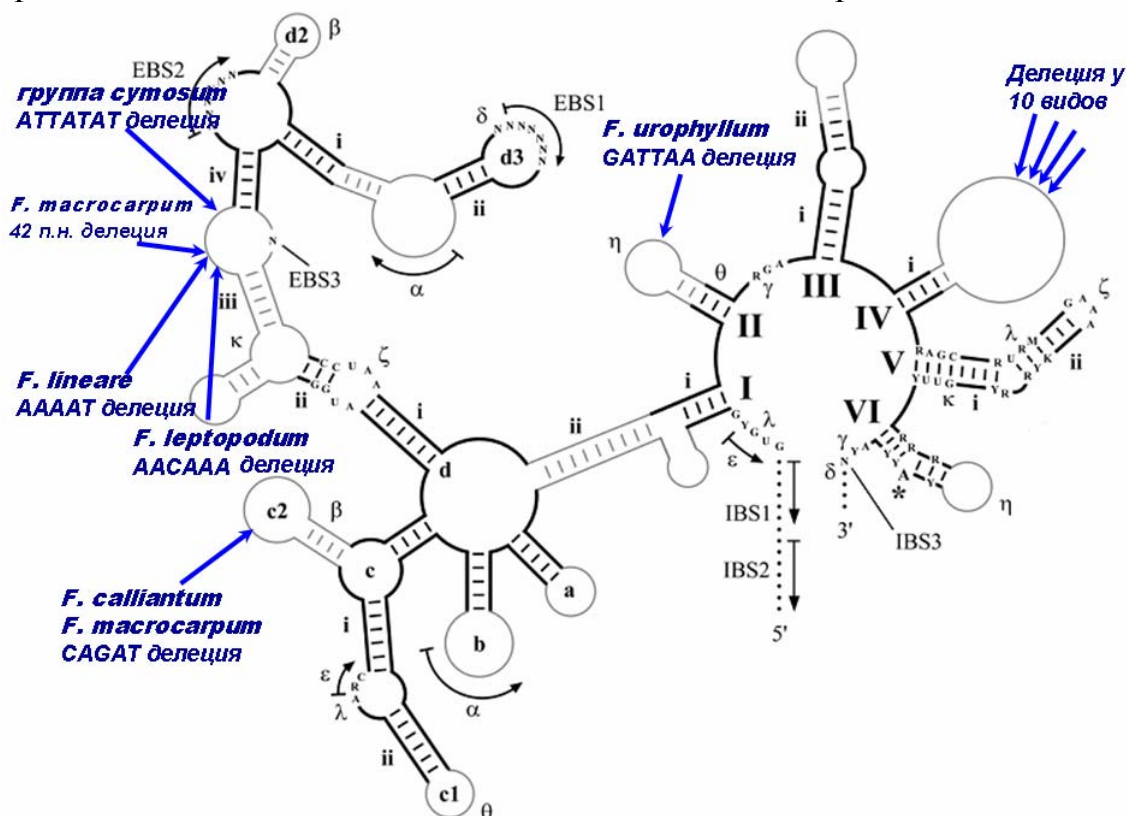


Рис. 14. Вторичная структура пре-мРНК интрона гена *rpS16* у представителей рода *Fagopyrum* (цифрами обозначены основные домены, буквами – субдомены и мотивы, стрелками показана локализация делеций)

Анализ полиморфизма последовательностей митохондриального генома видов *Fagopyrum*. В данной работе был также впервые проведен анализ варибельности последовательностей митохондриальной ДНК гречихи, оценен внутривидовой, межвидовой и межродовой полиморфизм и на основе полученных данных выявлены межвидовые филогенетические отношения. Для исследования митохондриального генома гречихи был выбран ген *cox 1* и b/c интрон гена *nad1*, относящийся к группе II интронов. Для проведения сравнительного анализа в исследование были взяты те же 29 образцов *Fagopyrum*, что и для анализа хпДНК.

Впервые была определена последовательность гена *cox 1*. Длина выровненной последовательности составила 555 п.н. В анализируемом наборе варибельными оказались 27 нуклеотидных сайтов, что составило 4.9% от всей длины выровненной последовательности.

Впервые было показано, что ген *cox1* у *Fagopyrum* не содержал интрон.

Также впервые была определена последовательность b/c интрона гена *nad1*. Размеры интрона варьировали от 1217 п.н. у представителей видов

F. tataricum, *F. cymosum* и *F. giganteum* до 1239 п.н. у образцов вида *F. capillatum*. Последовательность б/с интрона гена *nad1* видов *Fagopyrum* была GA-богата и характеризовалась наличием небольшого количества нуклеотидных замен 17 нуклеотидных сайтов (1.4%). В результате анализа внутривидовой вариабельности б/с интрона *nad1* мтДНК для вида *F. esculentum* были впервые выявлены митотипы.

Помимо нуклеотидных замен при анализе интрона *nad1* у видов рода *Fagopyrum* и рода *Rheum* также были обнаружены индели (рис. 15).

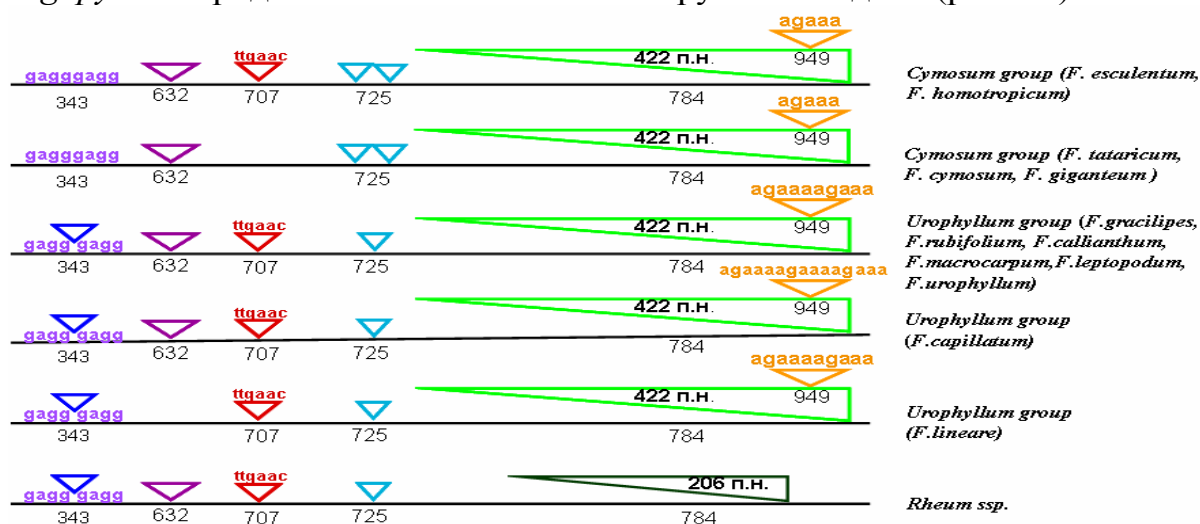


Рис. 15. Схема интрона *nad1* у представителей рода *Fagopyrum*, показывающая локализацию инсерций и делеций (треугольниками обозначены инсерции; цифрами - положения нуклеотидов от начала спейсера)

У всех анализируемых видов рода *Fagopyrum* в положении 784 от начала интрона была обнаружена вставка (422 п.н.). Интересно, что у *Rheum tanguticum* в том же положении инсерция была вдвое короче (206 п.н.) и отличалась по первичной последовательности. Внутри этой вставки у видов *Fagopyrum* хотелось бы отметить последовательность AGAAA в положении 949. У всех видов группы *cymosum* данный пентануклеотид присутствовал в последовательности один раз. У всех анализируемых видов группы *urophyllum* последовательность AGAAA была повторена тандемно, кроме вида *F. capillatum*, у которого этот пентануклеотид повторялся трижды (рис. 15). Помимо инсерций для некоторых видов рода *Fagopyrum* были выявлены свои специфичные делеции. Так, виды *F. tataricum*, *F. cymosum* и *F. giganteum* характеризовались делецией 6-нуклеотидной последовательности TTGAAC в позиции 707, тогда как у всех остальных анализируемых видов групп *cymosum* и *urophyllum* рода *Fagopyrum* и у *Rheum tanguticum* данная последовательность присутствовала (рис. 15).

На основе выявленного полиморфизма последовательности гена *cox1* и б/с интрона *nad1* мтДНК были построены дендрограммы, которые показали четкую кластеризацию видов на две группы.

Один кластер объединил все виды, относящиеся к группе *cymosum*, второй кластер образовали виды группы *urophyllum*. Анализ митохондриального генома так же, как анализ хлоропластного генома показал четкую дифференциацию группы *cymosum* на два субкластера: один

субкластер объединил виды *F. esculentum* и *F. homotropicum*, второй – *F. tataricum*, *F. cymosum* и *F. giganteum*. В то же время группа *urophyllum* не разделилась на субкластеры, которые были выявлены при анализе хлоропластной ДНК. Таким образом, полученные данные позволили определить возможные направления эволюции мтДНК видов гречихи. Было показано, что последовательность б/с интрона *nad1* может быть использована для таксономических и филогенетических исследований гречихи.

Анализ вторичной структуры последовательность б/с интрона гена *nad1* представителей *Fagopyrum*. б/с интрон гена *nad1*, также как интрон *rpS16*, относится к группе интронов II типа.

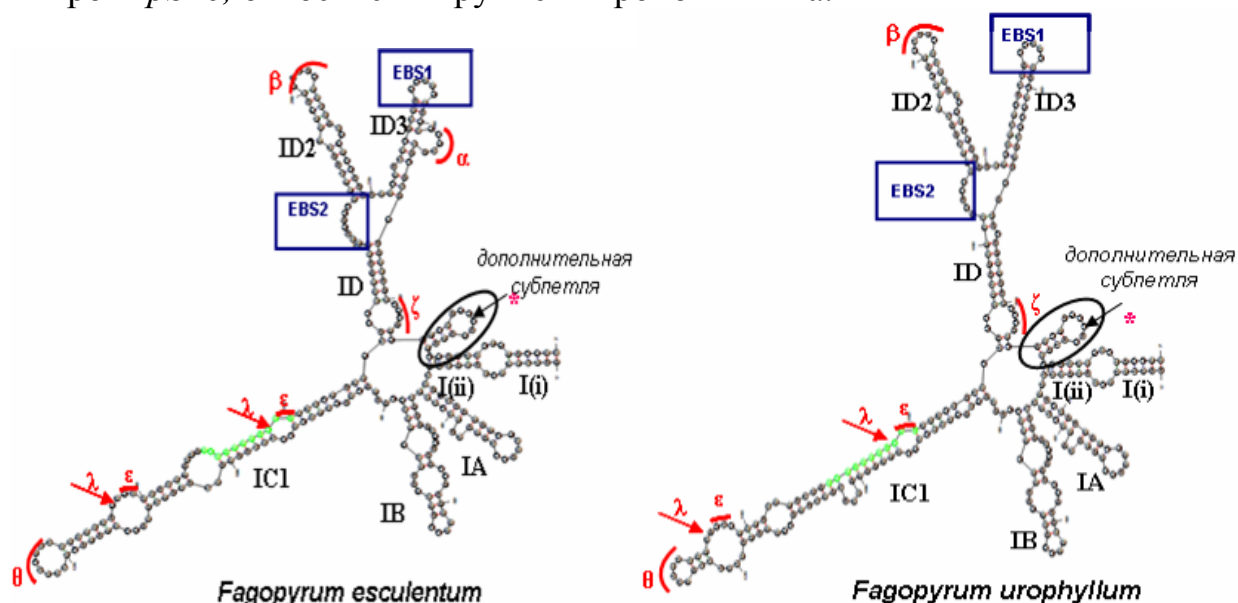
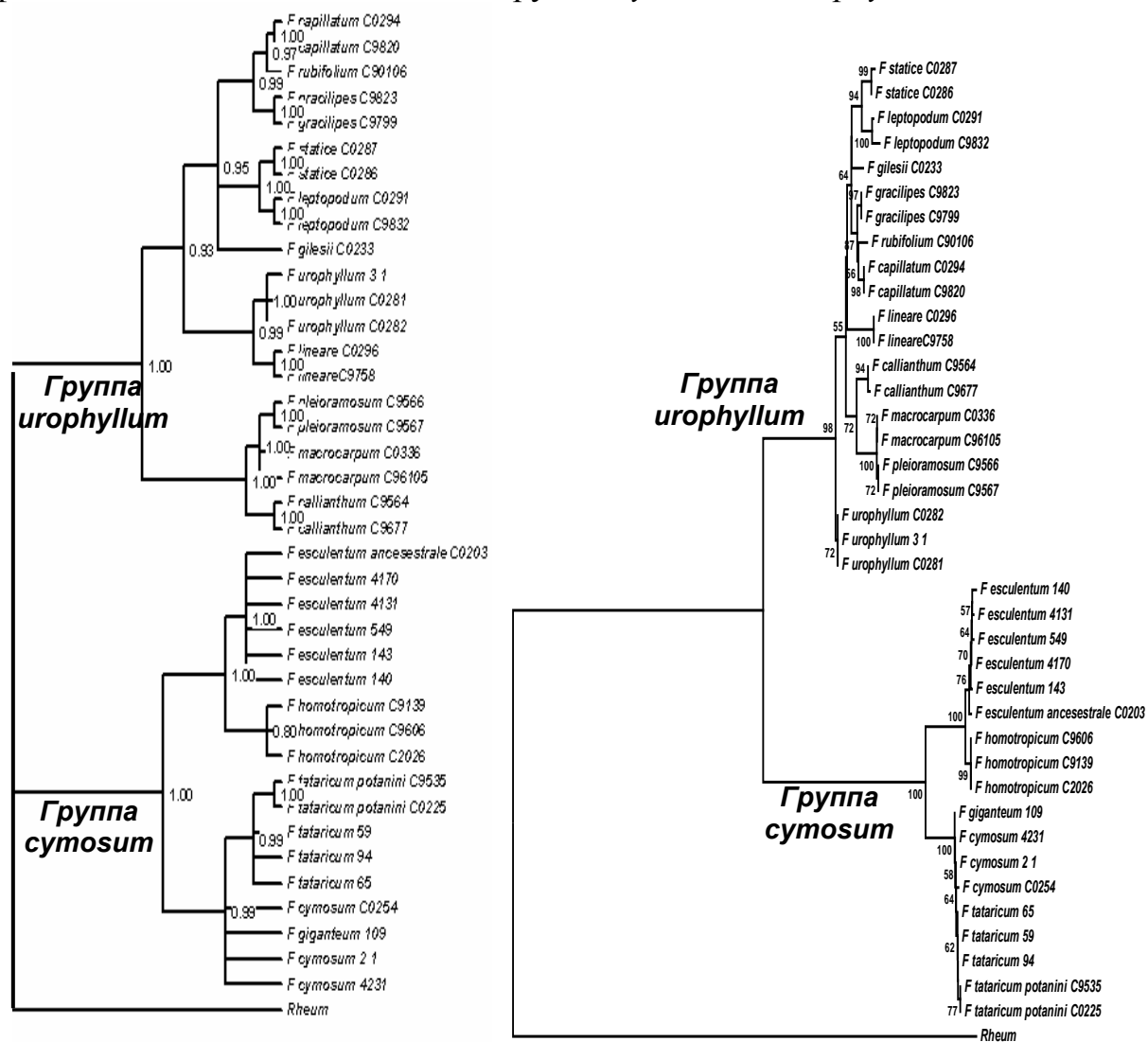


Рис.16. Вариабильность вторичной структуры домена I б/с интрон гена *nad1* у представителей рода *Fagopyrum*. (буквами обозначены, – субдомены и мотивы).

Анализ вторичной структуры б/с интрона гена *nad1* у видов *Fagopyrum* позволил определить границы всех доменов и основные функционально-значимые мотивы. Также как и в случае интрона *rpS16*, у всех видов *Fagopyrum* последовательности доменов III и V были полностью консервативны, что согласуется с их функциональной важностью. Наиболее вариабельными были домены I и IV. Так в последовательности домена I, помимо 6 нуклеотидных замен, было показано отсутствие последовательности α -мотива у представителей *F. urophyllum* (рис. 16). Домен IV был наиболее полиморфным и, помимо замен, было выявлено 5 различных инделей, как видоспецифичных (делеция TCTAGAGAGG у *F. lineare*, инсерция AGAAAAGAAA у *F. capillatum*), так и специфичных для групп видов (инсерции AAAGAAGGAGG у группы *urophyllum*, AACTT – у группы *cymosum*).

Комплексный анализ полиморфизма последовательностей хлоропластной и митохондриальной ДНК видов *Fagopyrum*. Заключительным этапом оценки внутривидового и межвидового полиморфизма хлоропластной и митохондриальной ДНК, выявления филогенетических отношений и определения возможных направлений эволюции ДНК последовательностей *Fagopyrum* явилось проведение

комплексного анализа геномной ДНК гречихи. На основании данных о вариабельности хпДНК и мтДНК NJ-, MP- и ML методами были построены общие дендрограммы, которые в основном совпадали по типу кластеризации видов в целом (рис. 17). Все виды, взятые в анализ, на дендрограммах выделились в два четких кластера, первый кластер образовали виды группы *cymosum* (*F. esculentum*, *F. homotropicum*, *F. tataricum*, *F. cymosum*, *F. giganteum*). Второй кластер – виды группы *urophyllum* (*F. gracilipes*, *F. capillatum*, *F. rubifolium*, *F. callianthum*, *F. macrocarpum*, *F. leptopodum*, *F. lineare*, *F. pleioramosum*, *F. statice*, *F. gilesii*, *F. jinshaense*, *F. urophyllum*). Эти данные полностью подтвердили результаты Ohnishi O. (1998) и Yamane *et al.* (2003) по разделению всех видов рода *Fagopyrum* на две филогенетически-эволюционные группы *cymosum* и *urophyllum*.



А

Б

Рис.17. Bayes- (А) и NJ -(Б) дендрограммы, построенные на основании данных анализа последовательностей хпДНК и мтДНК, показывающие различия видов *Fagopyrum* (в узлах обозначены, индексы Байеса (А) индексы бутстрепа (Б))

Кроме этого в каждом кластере выделилось по несколько субкластеров. Так, виды первого кластера (группа *cymosum*) разделились на два субкластера. В первый субкластер объединились виды *F. esculentum* и *F. homotropicum*, а во второй *F. tataricum*, *F. cymosum* и *F. giganteum*, что

также подтвердило ранее полученные данные о делении видов группы *cymosum* на две эволюционные ветви [Ohnishi and Matsuoka, 1996; Yasui and O. Ohnishi, 1998]. На дендрограмме, построенной по объединенным данным анализа хп и мт ДНК, виды группы *urophyllum* формировали несколько подкластеров: первый – *F. gracilipes*/*F. capillatum*/*F. rubifolium*; второй – *F. statice*/*F. leptopodum* и третий – *F. macrocarpum* /*F. pleioramosum* /*F. callianthum*. Такой же тип деления на субкластеры показали Т. Ohsako и О. Ohnishi (2000), изучая филогенетические отношения между видами группы *urophyllum*.

До сих пор остается непонятным систематическое положение трех видов – *F. urophyllum*, *F. lineare* и *F. gilesii*. Оценка филогении методом Байеса выявило вероятное родство видов *F. urophyllum* и *F. lineare*. В тоже самое время при использовании метода NJ эти виды, наоборот, образовывали отдельные кластеры, причем кластер *F. urophyllum* занимал базальное положение по отношению к другим видам группы *urophyllum*. Ранее О. Ohnishi и Y. Matsuoka (1996) отмечалось, что вид *F. urophyllum*, входя в состав филогенетической группы *urophyllum* по морфологическим признакам может занимать промежуточное положение между группами *cymosum* и *urophyllum*. Вид *F. gilesii* во всех случаях образовывал самостоятельную ветвь и не проявлял сходства с какими-либо видами группы *urophyllum*. Также хотелось бы отметить, что до 1991 года предком вида *F. esculentum* считался вид *F. cymosum* [Campbell, 1976, Nagatomo, 1984]. Однако эта гипотеза согласно данным проведенного маркирования ядерной и цитоплазматической ДНК, скорее всего, несостоятельна. Несмотря на морфо-биологическое сходство *F. cymosum* и *F. esculentum* рассчитанные нами коэффициенты генетических различий и сравнение последовательностей хп- и мтДНК показывают, что эти два вида лишь отдаленно родственны. Эти предположения совпадают с данными, приведенными в ряде работ [Kishima et al., 1995; Yasui et al., 1998], и подтверждают, что *F. cymosum* генетически более близок к виду *F. tataricum*, чем к *F. esculentum*, поддерживая возможность происхождения *F. tataricum* от *F. cymosum* [Yamane et al., 2003].

Таким образом, нами впервые был проведен комплексный анализ хпДНК и мтДНК видов рода *Fagopyrum*. Это позволило оценить уровни межвидовой изменчивости как хлоропластной, так и митохондриальной ДНК геномов гречихи. Был обнаружен ряд видоспецифичных нуклеотидных замен и инделей, которые весьма эффективно могут быть использованы для филогенетических и таксономических исследований и выявления полиморфизма генома на разных таксономических уровнях.

ВЫВОДЫ

1. Методами мультилокусного анализа у видов *Fagopyrum* идентифицировано 746 полиморфных ДНК-фрагментов, определены уровни межвидовой и внутривидовой вариабельности ДНК последовательностей гречихи из них 245 видоспецифичных фрагментов и 5 фрагментов, характерных для филогенетических групп. Уровень межвидового

полиморфизма последовательностей варьирует в пределах 0.19-0.33. Внутривидовой полиморфизм *F. tataricum* в два раза ниже, чем у *F. esculentum*. Уровень межсортовых различий *F. esculentum* соответствует диапазону геномной вариабельности дикорастущих образцов *F. esculentum* 0.10-0.28.

2. Методом SSR маркирования у видов группы *cymosum* выявлено 75 аллельных вариантов семи микросателитных локусов гречихи:

- для каждого локуса определены аллельные варианты, частоты их встречаемости и коэффициенты информативности.
- для каждого анализируемого генотипа установлена SSR формула, которая может быть использована для составления молекулярно-генетического паспорта.

3. Охарактеризованы последовательности спейсерных участков (*trnL-trnF*, *psbA-trnH*, *trnT-trnY*) и интрона гена *rpS16* хлоропластной ДНК *Fagopyrum*:

- выявлены видоспецифичные нуклеотидные замены и индели.
- выявлены гаплотипы хп ДНК для видов *F. homotropicum*, *F. tataricum* и *F. cymosum*.

4. Охарактеризованы последовательности гена *cox1* и b/c интрона гена *nad1* митохондриальной ДНК *Fagopyrum* и определены уровни внутривидового и межвидового полиморфизма:

- показано отсутствие интрона в гене *cox1*.
- идентифицированы видоспецифичные инсерции и делеции в последовательности интрона b/c гена *nad1*.

5. Определены вторичные структуры автосплайсирующихся интронов группы II у видов *Fagopyrum* хлоропластного гена *rpS16* и b/c интрона митохондриального гена *nad1*:

- определены границы шести доменов интрона, их основные функционально-значимые мотивы,
- выявлены видоспецифичные нуклеотидные замены и индели.

6. По результатам комплексного молекулярного анализа проведена сравнительная оценка филогений по ядерному, хлоропластному и митохондриальному геномам. Выявлена значительная дивергенция видов *F. esculentum*/*F. homotropicum* от *F. tataricum*/*F. cymosum* и подтверждена близкородственность видов *F. statice* – *F. leptopodum* и *F. macrocarpum* – *F. pleioramosum* – *F. callianthum*.

ПУБЛИКАЦИИ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кадырова Г.Д., Кадырова Ф.З., Рыжова Н.Н., Кочиева Е.З. RAPD-анализ геномного полиморфизма видов и сортов рода *Fagopyrum* // Экологическая генетика. – 2008. – Т. VI. – №3. – С. 3-10.

2. Кадырова, Г.Д., Кадырова Ф.З., Мартирисян Е.В., Рыжова Н.Н. Анализ геномного разнообразия образцов и сортов гречихи посевной и татарской ISSR- методом // Сельскохозяйственная биология. – 2010. – №5. – С.42-48.

3. **Кадырова, Г.Д., Рыжова Н.Н., Кочиева Е.З.** Филогенетические отношения у видов *Fagopyrum*, основанные на данных анализа b/c интрона гена *nad1* // Вестник МГУ, 2010. – № 4. – С. 162-164.
4. **Кадырова Г.Д., Рыжова Н.Н.** Молекулярный анализ геномного и пластомного полиморфизма видов рода *Fagopyrum* // Материалы научно-практической конф. «Генетика и селекция растений», 8-12 декабря М., 2008.
5. **Кадырова Г.Д., Е.В. Мартирисян, Н.Н. Рыжова** Оценка геномного полиморфизма культивируемых видов и сортов *Fagopyrum* с помощью молекулярных методов // V съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров». – М., 21-28 июня 2009г. – часть I. – С. 238.
6. **Kadyrova G.D., E.Z. Kochieva** Phylogenetic relationships in *Fagopyrum* species based on nucleotide polymorphism of b/c intron of *nad1* gene // 2nd Moscow International Conference «Molecular Phylogenetics» (MolPhy-2), Moscow, May 18-21, 2010. – 2010. – P. 106
7. **Kochieva EZ., Kadyrova GD., Ryzhova NN.** . Variability of plastid and mitochondrial sequences in *Fagopyrum* species // Proceedings of the 11th International Symposium on Buckwheat «Advances in buckwheat research», Orel, July 19-23 2010. – 2010. – P. 265-267.
8. **Kadyrova G, Martirosyan E, Ryzhova N.** Analysis of nucleotide polymorphism and secondary structure of the *rps16* intron in *Fagopyrum* species // Proceedings of the 11th International Symposium on Buckwheat «Advances in buckwheat research», Orel, July 19-23, 2010. – 2010. – P. 329-330.
9. **Kadyrova G.D., Kochieva E.Z., Ryzhova N.N.** Nucleotide polymorphism and secondary structure of the mitochondrion *nad1i477* intron in *Fagopyrum* species. PLANTGEM Istanbul, May 4-7, 2011. P.98.

Отзывы на автореферат просьба отправлять по адресу 420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, КФУ, Отдел аттестации научных кадров, Диссертационный совет Д 212.081.08, Ученому секретарю З.И. Абрамовой, факс: (843)238-76-01